

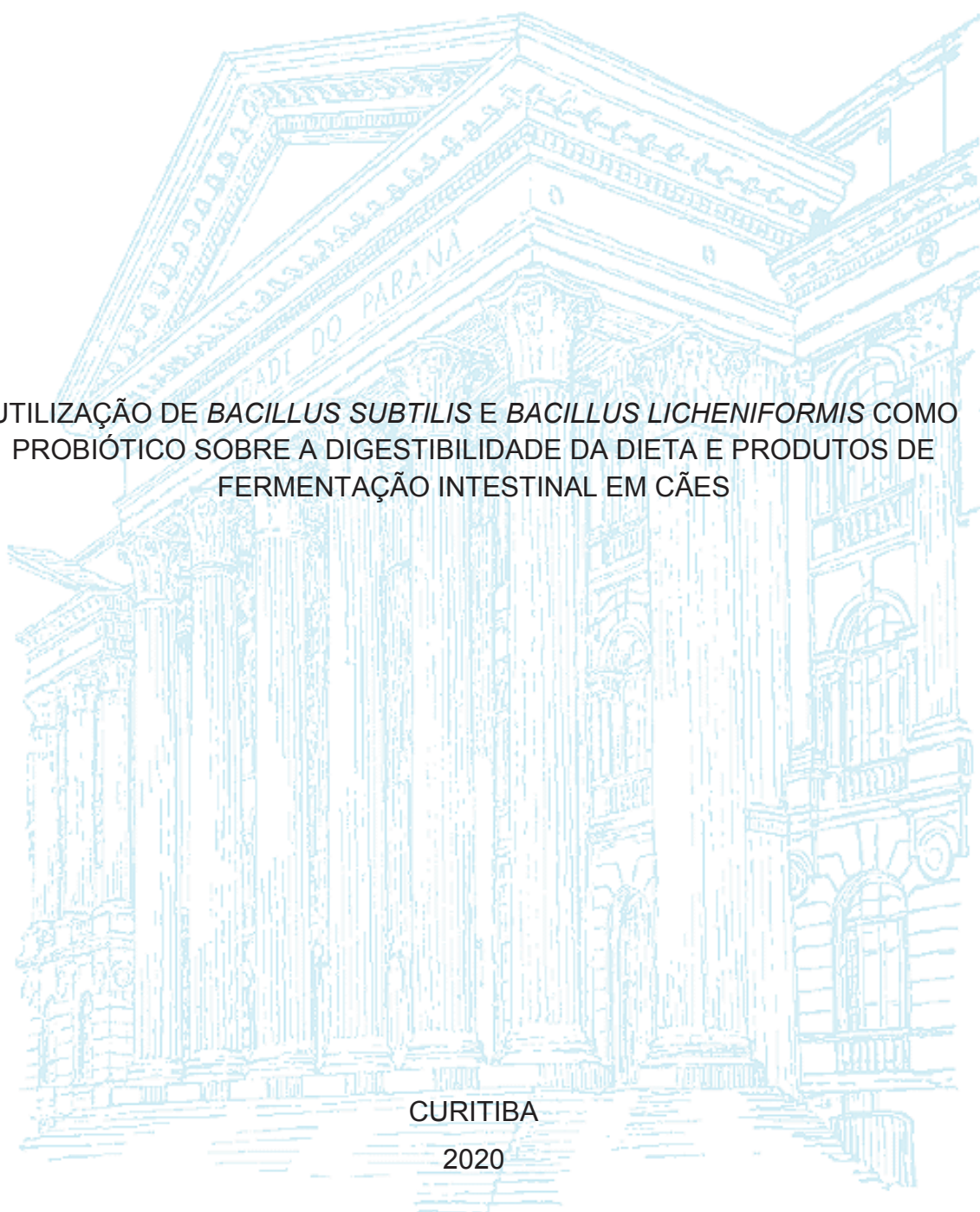
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAIS SILVINO BASTOS

UTILIZAÇÃO DE *BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS LICHENIFORMIS* COMO  
PROBIÓTICO SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA DIETA E PRODUTOS DE  
FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES

CURITIBA

2020



TAIS SILVINO BASTOS

UTILIZAÇÃO DE *BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS LICHENIFORMIS* COMO  
PROBIÓTICO SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA DIETA E PRODUTOS DE  
FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, ofertado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como um dos requisitos à obtenção de Título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ananda Portella Félix.

CURITIBA

2020

Bastos, Tais Silvino

Utilização de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* como probiótico sobre a digestibilidade da dieta e produtos de fermentação intestinal em cães / Tais Silvino Bastos

. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.  
Orientadora: Ananda Portella Félix.

1. Aminoácidos. 2. Fezes - Análise. 3. Intestinos - Cães. 4. Microbiota.  
I. Félix, Ananda Portella. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

Sistema de Bibliotecas/UFPR, Biblioteca de Ciências Agrárias  
Fernando Moreira - CRB9/1665



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -  
40001016082P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TAÍS SILVINO BASTOS** intitulada: **Utilização de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* como probióticos sobre a digestibilidade da dieta e produtos de fermentação intestinal em cães**, sob orientação da Profa. Dra. ANANDA PORTELLA FÉLIX, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2020.

ANANDA PORTELLA FÉLIX

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SIMONE GISELE DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARIANA SCHERAIBER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 012/2019, referente ao projeto “Utilização de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* como probióticos sobre a digestibilidade da dieta e produtos de fermentação intestinal em cães”, sob a responsabilidade Ananda Portella Félix – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 17/04/2019.

Vigência do projeto	Abril/2019 até Maio/2019
Espécie/Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i> (cão)
Número de animais	16
Peso/Idade	10,3 kg/41 meses
Sexo	Macho e fêmeas
Origem	Laboratório de Estudos em Nutrição Canina da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 012/2019, regarding the project “Use of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* as probiotics on digestibility of diet and intestinal fermentation products in dogs” under Ananda Portella Félix supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 17/04/2019.

Duration of the project	April/2019 until May/2019
Specie/Line	<i>Canis lupus familiaris</i> (canine)
Number of animals	16
Wheight/Age	10.3 kg/41 months
Sex	Male and female
Origin	Laboratório de Estudos em Nutrição Canina of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Curitiba, 17 de abril de 2019

*Chayane da Rocha*

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

**Dedico:**

À minha amada família

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãezinha linda – pelo amor desmedido, incondicional, perseverante, exagerado. Foi quem me ensinou tudo que sei sobre o amor, e tudo que também não sei; que não fui capaz de aprender. Ela é força, é luz, é suor, é batalha, é renascimento, é vitória, é amor (o tempo todo). É a palavra que faltou no dicionário. Mãe, meu amor é imenso, e você ainda maior. Passamos por momentos difíceis que se você não fizesse tanto e tudo, eu jamais teria chance de sequer frequentar uma Universidade – foi por nós.

Agradeço ao meu amado Paizinho, por seu amor incondicional, seus cuidados únicos e mimos constantes; ao Willy, por ser um grande irmão (quicá, o melhor do mundo), tão amável, carinhoso, cuidadoso, companheiro de toda vida – meu sansão! Ambos com os corações mais bondosos que conheço, exemplos de simplicidade e prestatividade.

Ao meu marido e companheiro Adriano, sobretudo, pelo seu ser autêntico: forte, justo e corajoso; pela beleza de seu espírito, pelo brilho de sua alma que ilumina nosso mundo. Agradeço por ter adentrado em minha vida e me incentivado, em todos os sentidos, a chegar até aqui. Por tudo que já vivemos e que a vida nos guarda. Diante disso, sou grata por ser o amor da vida do amor da minha vida.

À minha Vózinha Iracema, que representa todos meus avôs em vida - agradeço pelo amor, torcida e orações. Aos demais familiares por serem meu alicerce e porto seguro. Sou grata, sobretudo, ao lar amoroso e a estrutura familiar na qual me desenvolvi.

À Professora Ananda Portella Félix, por sua imensurável generosidade, inteligência, dedicação e amor. Pela orientação atenta, cuidadosa e rigorosa. Sempre acreditando em meus resultados, me encorajando ao caminho mais desafiador e de certo modo, prazeroso. Por ter uma verdadeira postura de professora e pesquisadora – algo um tanto raro nos dias de hoje. “Quando houve dúvidas – você me trouxe a fé; onde houve trevas – você me trouxe a luz; onde houve erros - você me trouxe a verdade.” (Oração da paz, adaptada).

À Professora Simone Gisele Oliveira, pelo apoio, incentivo, pelas portas sempre abertas, pelo exemplo intelectual e de generosidade. Por ter me acompanhado desde meus primeiros passos da vida acadêmica como orientadora de IC, e por toda sua doçura comigo. Ao Professor Alex Maiorka, pela figura de grande profissional. Vocês são Professores que nutro profunda admiração e eterna gratidão.

A toda equipe do LENCAN, LEPNAN, LNA. Agradeço por tornar possível tudo que conquistei como discente. Sou grata principalmente a Marley (minha amada bff, pelo laço de amizade que construímos e que irá nos acompanhar pra sempre), Alina, Camilla, Gislaine e Tati por toda troca de aprendizado e por deixarem meus dias mais leves – Vocês foram fundamentais! E a Dani – guardo seus ensinamentos: Esse trabalho é nosso!

A minha banca de qualificação e defesa Chayane Rocha, Simone Oliveira e Mariana Scheraiber por terem aceitado participar desse grande passo da minha vida e pelas considerações tão relevantes.

Aos meus pequenos: Amora, Amarula, Babalu, Cacau, Chanel, Olivia, Tequila, Paçoca, Bud, Scooby, Toddy, Thor, Xuxo, Solução, Bexiga e Cookie que pude dividir momentos de muitas lambidas, respeito, paz e amor.

A todos os animais que passaram ou passam por minha vida. Ofereço todo meu respeito e gratidão por me ensinarem o amor mais puro do mundo. Em especial: Malvina (minha pistolinha) e Grigri (in memoriam) – quanta saudade.

A empresa DSM pelo auxílio na pesquisa.

Ao PPGZ da UFPR pela oportunidade.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada a todos que deixaram um pouco de si e levaram um pouco de mim.

Essa conquista é nossa!





## RESUMO

Aditivos alimentares constituídos por microrganismos vivos, uma vez introduzidos na dieta podem influenciar benéficamente o hospedeiro, por meio do balanço da microbiota intestinal. Nesse sentido, objetivou-se avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia metabolizável (EM) da dieta, características fecais e produtos da fermentação intestinal de cães suplementados com *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Foram utilizados 16 cães adultos da raça Beagle, os quais foram distribuídos inteiramente ao acaso, em dois tratamentos: controle e dieta com 62,5 g de probiótico/ton. Os animais passaram por um período de 20 dias de adaptação às dietas, seguidos por cinco dias de coleta total de fezes. As características fecais foram avaliadas por meio de matéria seca, escore, odor, ácido siálico, pH, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, aminas biogênicas, fenóis e indóis. Não houve diferença na digestibilidade dos nutrientes ( $P>0,05$ ). Contudo, a suplementação com probiótico melhorou a consistência das fezes, bem como diminuiu o odor fecal, tanto para as amostras frescas quanto após 6 horas de defecação ( $P<0,001$ ). Também houve redução ( $P<0,05$ ) na concentração das aminas biogênicas: putrescina, espermidina e cadaverina, nos fenóis e quinolina, com a inclusão do probiótico. O uso de *B. subtilis* e *B. licheniformis* reduz a concentração de produtos de fermentação nitrogenada nas fezes e o odor fecal de cães.

Palavras-chave: aminas biogênicas; consistência fecal; funcionalidade intestinal; microbiota intestinal; odor fecal.

## ABSTRACT

Food additives made up of living microorganisms once introduced into the diet can beneficially influence the host the balance of the intestinal microbiota. In this sense, the objective was to evaluate the digestibility on the apparent digestibility coefficients of nutrients and diet metabolizable energy, fecal characteristics and intestinal fermentation products of dogs supplemented with *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Sixteen adult Beagle dogs were used and distributed entirely randomly in two treatments: control and diet with 62.5 g probiotic / ton. The animals went through a period of 20 days of adaptation to diets, followed by five days of total feces collection. Fecal characteristics were evaluated by dry matter, score, odor, sialic acid, pH, ammonia, short chain and branched fatty acids, biogenic amines, phenols and indoles. There was no difference in nutrient digestibility ( $P > 0.05$ ). However, probiotic supplementation increased stool consistency as well as decreased fecal odor for both fresh samples and after 6 hours of defecation ( $P < 0.001$ ). There was also a reduction ( $P < 0.05$ ) in the concentration of biogenic amines: putrescine, spermidine and cadaverine, in phenols and quinoline, with the inclusion of probiotic. The use of *B. subtilis* and *B.licheniformis* reduces the concentration of nitrogenous fermentation products in faeces and fecal odor in dogs.

Key-words: biogenic amines; fecal consistency; intestinal functionality; intestinal microbiota; odor fecal.

## LISTA DE FIGURAS

**CAPÍTULO I** – Utilização de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* como probióticos sobre a digestibilidade da dieta e produtos de fermentação intestinal em cães.

Figura 1 - Principais etapas do ciclo de esporulação do *Bacillus subtilis*. Adaptado: (Errington, 2003)..... 21

**CAPÍTULO II** – *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odor in dogs.

Figure 1 - Points frequency of faecal odor scores attributed by evaluators (n = 50). 1 = less fetid odor; 2 = same odor and 3 = more fetid odor, as compared to faeces of dogs fed the control diet..... 44

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO I** – Utilização de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* como probióticos sobre a digestibilidade da dieta e produtos de fermentação intestinal em Cães.

Tabela 1 - Principais produtos de fermentação intestinal e seus respectivos substratos.....20

**CAPÍTULO II** – *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odor in dogs.

Table 1 - Means of ATTD and ME of diets with or without DFM..... 39

Table 2 - Means of faecal characteristics of dogs fed diets with or without DFM..... 40

Table 3 - Means of SCFA and BCFA in faeces of dogs fed diets with or without DFM..... 41

Table 4 - Faecal score and odor medians and interquartile of dogs fed diets with or without DFM..... 42

Table 5 - Means of biogenic amines (mg/kg) in the faeces of dogs fed diets with or without DFM..... 43

Table 6 - Mean percentage of peak areas of more abundant volatile organic compounds present in faeces of dogs..... 44

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AGCC – Ácido graxo de cadeia curta

AGCR – Ácido graxo de cadeia ramificada

CDA – Coeficiente de digestibilidade aparente

## SUMÁRIO

Capítulo I - Utilização de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* como probióticos sobre a digestibilidade da dieta e produtos de fermentação intestinal em cães.

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
2.1 Produtos de fermentação intestinal.....	19
2.2 Probióticos .....	20
2.3 Probióticos na alimentação de cães.....	21
2.4 Produção de esporos bacterianos pelos <i>Bacillus</i> .....	22
2.5 <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> na nutrição animal .....	24
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>25</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>27</b>
Capítulo II - <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Bacillus licheniformis</i> reduce faecal protein catabolites concentration and odor in dogs .....	35
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>36</b>
<b>BACKGROUND .....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>49</b>
<b>METHODS .....</b>	<b>49</b>
Animals and housing.....	49
Experimental diets.....	50
Experimental procedures .....	51
Calculations and Statistical analyses .....	55
<b>REFERENCES .....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A saúde e o bem-estar dos animais de companhia dependem, além de outros fatores, do equilíbrio da microbiota intestinal. Alterações na microbiota intestinal colônica podem levar ao desenvolvimento de doenças, distúrbios gastrintestinais, toxicidade, alergias e estresse (LEE et al., 2014).

Dentre as bactérias que compõem a microbiota intestinal, os microrganismos proteolíticos podem fermentar compostos nitrogenados que não foram absorvidos (HUSSEIN et al., 1999). A partir dessa fermentação, há a formação de catabólitos como as aminas biogênicas, fenóis, indóis e amônia, os quais aumentam o pH do cólon e favorecem o desenvolvimento de microrganismos com potencial patogênico (VAINSHTAIN, 2014). Isso pode acarretar em disbiose (condição de desequilíbrio da microbiota intestinal) e assim afetar a funcionalidade intestinal de maneira negativa, favorecendo processos inflamatórios, além de piorar o odor fecal dos cães (WOLLOWSKI et al., 2001; SWANSON et al., 2002).

Dessa forma, probióticos específicos ou suas combinações, estão cada vez mais sendo utilizados na nutrição canina. Esses aditivos podem ser definidos como colônias de microrganismos vivos que, ao serem suplementados na dieta, atuam positivamente no equilíbrio da microbiota intestinal de seu hospedeiro, em favor dos microrganismos considerados benéficos (FELICIANO, 2008; FÉLIX et al. 2010).

A suplementação de probióticos na dieta de animais monogástricos pode ser recomendada a fim de auxiliar na manutenção da estabilidade e no restabelecimento da microbiota intestinal com potencial benéfico, como também após desequilíbrios causados por estresse (FERNANDES et al., 2000). Ainda, outros estudos têm demonstrado efeitos positivos dos probióticos sobre as características fecais de cães, como a redução no odor das fezes, melhoria no quadro de diarreia utilizando *Bacillus subtilis* (C-3102), ao adicionar 0.5g/100g (PAAP et al., 2016) e aumento da consistência fecal suplementando 0.01g/100g (FÉLIX et al., 2010).

O *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* são exemplos de probióticos que podem ser utilizados na nutrição canina. Esse gênero de bactéria apresenta

vantagens sobre os demais por possuir maior estabilidade durante o armazenamento do alimento e resistência ao pH do estômago e sais biliares, pelo fato de ser comercializado em sua forma esporulada (BIOURGE et al., 1998). Assim, conferindo maior viabilidade no alimento, resistência ao pH ácido do estômago e sais biliares (HOA et al., 2000, COPPOLA e TURNÊS, 2004, FÉLIX et al., 2010).

Sendo assim, serão discutidos neste trabalho os principais aspectos do uso desses probióticos na nutrição canina e o que sua utilização pode acarretar na funcionalidade intestinal e produtos de fermentação intestinal de cães.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL

O lúmen intestinal possui um conjunto complexo e dinâmico de microrganismos, denominado microbiota intestinal (HAMER et al., 2011). A microbiota intestinal desempenha um papel importante na fisiologia do intestino, sendo responsável por diversas funções: metabolismo e fermentação dos nutrientes que não foram absorvidos, prevenção da colonização por potenciais patógenos – por meio da produção de substâncias antimicrobianas, competição por nutrientes e sítios de ligação no epitélio intestinal (NRC, 2006).

As bactérias que compõem a microbiota intestinal podem fermentar alguns nutrientes que não foram absorvidos no lúmen do intestino, como os aminoácidos, por meio de desaminação, desaminação-descarboxilação e/ou descarboxilação (HUSSEIN et al., 1999), formando assim outros compostos. A partir dessa fermentação, há a formação de catabólitos de aminoácidos, como a amônia, aminas biogênicas, ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), compostos contendo enxofre, fenóis e indóis (HENDRIKS et al., 2012). Em excesso, grande parte desses catabólitos pode influenciar a funcionalidade intestinal de maneira negativa, contribuindo para processos inflamatórios, como a colite, carcinogênese do cólon, bem como interferir no odor fecal - deixando as fezes mais fétidas (WOLLOWSKI et al., 2001; SWANSON et al., 2002).

O aumento no fluxo de compostos nitrogenados que chegam ao cólon fornece substratos fermentativos para microrganismos com potencial patogênico, como algumas espécies do gênero *Clostridium* spp (BARRY et al., 2010), podendo contribuir com a disbiose.

As aminas biogênicas são compostos nitrogenados formados principalmente por meio da descarboxilação de aminoácidos livres por fermentação, decomposição, processos de putrefação (SANTOS, 1996) ou por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (SPANO et al., 2010). Sendo a histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, espermina e espermidina consideradas as mais importantes aminas biogênicas formadas (SHALABY, 1996).

Algumas bactérias gram-negativas com potencial patogênico, por exemplo, a *Escheria coli* e *Pseudomonas sp.*, foram descritas como capazes de produzir a enzima descarboxilase, resultando na formação das aminas biogênicas (COSTA et al., 2018).

A concentração de amônia no lúmen do intestino grosso é principalmente resultado da desaminação de aminoácidos por microrganismos no intestino (DAVILA et al., 2013). Quando em altas concentrações, além de serem tóxicas à mucosa, podem promover o desenvolvimento de tumores (LIN e VISEK, 1991).

A degradação de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano) pela microbiota intestinal pode produzir fenóis e indóis (BONE et al., 1976; DAVILA et al., 2013). Dentre os metabólitos gerados a partir desses compostos (aminas biogênicas, fenóis, indóis) que, ao favorecerem a produção de substratos para bactérias com potencial patogênico, podem contribuir para a carcinogênese de cólon (NOWAK et al., 2006). Os AGCR: isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato se originam exclusivamente da quebra de proteínas (MORTENSEN et al., 1996), sendo compostos derivados de valina, isoleucina e leucina, respectivamente (MACFARLANE et al., 1991). Quando em excesso, podem causar efeitos adversos à funcionalidade intestinal, além de piorar o odor das fezes (HUSSEIN et al., 1999).

Por outro lado, existem compostos produzidos por meio da fermentação bacteriana, que podem desempenhar um papel vital na manutenção da integridade e metabolismo do cólon. Exemplos disso são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), incluindo principalmente o acetato, butirato e propionato, os quais são rapidamente absorvidos pelo epitélio intestinal (SIMPSON, 1998).

Os principais substratos para a produção de AGCC são as fibras dietéticas e amido resistente (LAPARRA et al., 2010; DAVILA et al., 2013). Geralmente as fibras solúveis tendem a ser moderadamente fermentáveis pelos microrganismos do cólon resultando na produção de AGCCs, que são conhecidos por fornecerem energia aos colonócitos, reduzirem o pH luminal limitando assim, o crescimento de potenciais patógenos (ALEXANDER et al., 2019). Dietas com fibras fermentáveis favorecem maior concentração de *Lactobacillus* spp. e redução na população de microrganismos não desejáveis, como o *Clostridium perfringens* (SWANSON et al., 2002).

Já o amido resistente, por ser um alimento fermentado no intestino grosso principalmente pelas bifidobactérias, durante sua fermentação, produz AGCC (principalmente o butirato), que contribui para a saúde do cólon, inibindo o surgimento de células cancerígenas devido à redução do pH no intestino grosso (PEREIRA, 2007).

Dentre os AGCC, o butirato é o principal substrato energético utilizado pelos colonócitos (BJERRUM et al., 2006), suprimindo de 70 a 90% das necessidades energéticas dessas células (COOK e SELLIN, 1998) ele está envolvido também na proteção contra colite ulcerosa (BOSCH et al., 2008). Os AGCC, em geral, são capazes de reduzir o pH intestinal, tendo assim, uma capacidade bactericida contra bactérias sensíveis ao pH ácido (KNARREBORG et al., 2002). Além disso, a produção de AGCC estimula a absorção de água e eletrólitos além de aumentar a taxa de absorção de sódio, o que é responsável pela maior parte de água absorvida no lúmen intestinal (HERSCHEL et al., 1981; GUARNER e MALAGELADA, 2003), o que pode influenciar na consistência das fezes. Os principais produtos de fermentação intestinal estão apresentados na Tabela 1. Entre as ferramentas que possibilitam melhorar esse perfil de fermentação, estão os probióticos.

Tabela 1. Principais substratos e seus respectivos produtos de fermentação intestinal

Substrato	Produtos
Leucina, Isoleucina, Valina e Metionina, fibra dietética e amido resistente	<b>AGCC</b> Acético, Propiônico e Butírico
Valina Isoleucina Leucina	<b>AGCR</b> Isobutirato 2-metilbutirato Isovalerato
Fenilalanina, tirosina, triptofano	<b>Fenóis e Indóis</b>
Ornitina Metionina Lisina	<b>Aminas biogênicas</b> Putrescina Espermidina Cadaverina

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta

AGCR: ácidos graxos de cadeia ramificada

## 2.2 PROBIÓTICOS

Existem várias definições para o termo probiótico. Essa expressão foi introduzida pela primeira vez por LILLY e STILWELL (1965) para designar substâncias produzidas por meio de protozoários que estimulavam o crescimento de outros microrganismos. Posteriormente, PARKER (1974) os denominou como suplementos alimentares adicionados à dieta, incluindo microrganismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Por sua vez, FULLER (1989) definiu o termo probiótico como um suplemento alimentar com microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro por meio do equilíbrio microbiano intestinal, conceito comumente utilizado pela comunidade científica.

Além disso, existem alguns critérios para que um microrganismo seja considerado probiótico efetivo, como resistência à passagem através do trato gastrointestinal (GIRAFFA et al., 2010); aderência às superfícies epiteliais; atividade antagônica para patógenos intestinais e não apresentar histórico de patogenicidade (KOMATSU et al., 2008).

Quanto à nomenclatura, alguns microrganismos utilizados como probióticos não atendem completamente a definição e por isso alguns autores preferem utilizar o termo *direct-fed microbial* (DFM). O DFM foi definido pela *Food and Drug Administration dos EUA* (FDA) como um produto alimentar que contém a fonte de micróbios vivos naturalmente existentes. Como exemplo, cabe citar os microrganismos do gênero *Bacillus*, os quais embora haja relatos dos efeitos benéficos sobre a funcionalidade intestinal, são bactérias do solo, não sendo inerentes do trato gastrointestinal de animais e não apresentando a capacidade de formar colônias no intestino (transientes). Desse modo, não atendem completamente a definição de probiótico.

### 2.3 PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE CÃES

Diversos alimentos comerciais destinados aos cães contêm altos níveis proteicos em sua formulação e dependendo de suas fontes (valor biológico ou digestibilidade), pode resultar no aumento de compostos nitrogenados não digeridos no cólon, os quais podem ser substratos para o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Dessa forma, podem contribuir para formação de compostos putrefativos como amônia, aminas biogênicas, AGCR, compostos contendo enxofre, fenóis e indóis. Esses compostos são apontados como os principais componentes de mau odor das fezes, bem como podem ter influências indesejáveis na funcionalidade intestinal devido à sua toxicidade e ao favorecer a sobrevivência de bactérias com potencial patogênico (SWANSON et al., 2002; ZENTEK et al., 2003; SUCHODOLSKI, 2011; CELI et al., 2019). Nesse sentido, a busca por estratégias nutricionais que visem melhorar a funcionalidade intestinal e a qualidade das fezes dos cães estão sendo cada vez mais estudadas. Sendo assim, a suplementação de aditivos alimentares, como os probióticos, enseja importante ferramenta na busca da melhora dessas características.

Considerando a importância da microbiota intestinal e a ação das bactérias sobre a manutenção do funcionamento do intestino, os probióticos podem ser utilizados em qualquer situação ao longo da vida para manter ou restabelecer a eubiose, condição de equilíbrio da microbiota intestinal (FURLAN et al., 2004).

Entre os gêneros de probióticos mais utilizados na alimentação de cães, destacam-se os produtores de lactato: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Entretanto, a utilização de bactérias do gênero *Bacillus* apresenta vantagens sobre as demais para elaboração de probióticos. A principal delas, é a sua capacidade de esporular, que lhes confere maior resistência ao passar pelo pH ácido do estômago (HOA et al., 2000, COPPOLA e TURNÊS, 2004, FÉLIX et al., 2010) o que não acontece em espécies de *Lactobacillus* (TUOHY et al., 2007). Essa característica, na prática, traduz-se em garantir maior estabilidade desse probiótico ao meio durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (BIOUGE al., 1998, GIL TURNES et al., 1999).

#### 2.4 PRODUÇÃO DE ESPOROS BACTERIANOS PELOS *BACILLUS*

Os esporos bacterianos são produzidos na natureza como um meio de sobrevivência às condições ambientais extremas, que poderiam ser fatais para bactérias que não possuem tal capacidade. Esse mecanismo confere grande resistência ao microrganismo, como: às altas temperaturas (até 100 °C); ionização; radiação; solventes químicos; detergentes e enzimas hidrolíticas (NICHOLSON et al., 2000). Esse processo de resistência ocorre quando há uma inanição nas imediações da célula bacteriana ou em condições adversas, como altas temperaturas, pH do meio, restrição hídrica. Frente à essa situação, a bactéria entra em um programa de desenvolvimento que resulta na produção de um esporo. O endósporo é formado por um mecanismo que envolve divisão celular assimétrica, seguido por englobamento da menor (pré-esporo) pela maior célula (célula-mãe) (Figura 1).

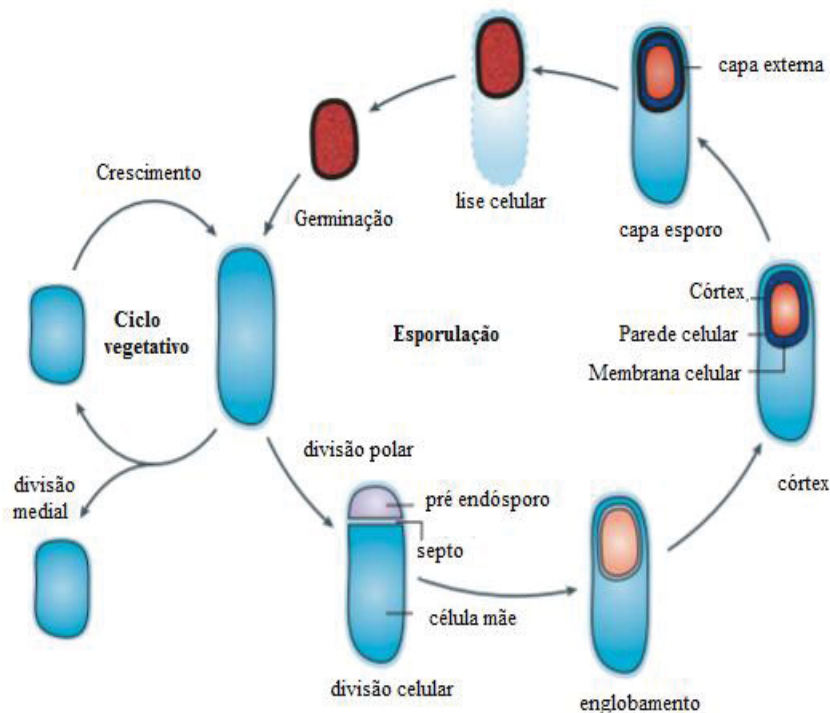


Figura 1. Principais etapas do ciclo de esporulação do *Bacillus subtilis*. Adaptado de ERRINGTON (2003).

O gênero *Bacillus* compreende microrganismos gram-positivos, anaeróbios facultativos, formadores de endósporos que podem ser isolados do solo ou plantas de todo o mundo (SNEATH, 1986). Como os solos ou plantas são variáveis em termos de disponibilidade de nutrientes, temperatura e pH, a esporulação é um processo fundamental para sua sobrevivência. Muitas bactérias formadoras de endósporos são utilizadas na indústria e medicina, sendo responsáveis pela produção de grande porção das enzimas industriais do mercado mundial, como também podem ser importantes agentes de biocontrole na agricultura (NICHOLSON et al., 2000, ERRINGTON, 2003).

Os *Bacillus* são capazes de excretar ou sintetizar diversas enzimas proteolíticas durante a sua fase de crescimento ou esporulação (VITKOVIC e SADOFF, 1977). Em algumas espécies é reconhecida a produção de antibióticos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*), a nitrificação e desnitrificação (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus azotoformans*) (SOUTO et al., 2004).

Essas espécies formadoras de esporos produzem substâncias antagonistas ao desenvolvimento de microrganismos com potencial patogênico - diretamente pela modulação da microbiota intestinal ou fortalecendo o sistema imunológico do hospedeiro. Ainda, esses microrganismos podem agir após a excreção, ao produzirem enzimas que degradam a matéria orgânica das fezes, reduzindo a produção de amônia (VAINSHTAIN, 2014).

Dentre as várias espécies de *Bacillus* para a produção de endósporos, destacam-se o *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, sendo os mais utilizados como probióticos para animais (CASULA et al., 2002). A utilização dessas espécies em alimentos extrusados destinados aos cães pode ser viável devido à sua capacidade de esporulação – o que garante que esses microrganismos alcancem o intestino sem perder sua eficiência. O fato de o gênero *Bacillus* pertencer às bactérias transitórias da microbiota intestinal dos cães (SCOTT; MILLER; GRIFFIN et al., 2001), a colonização intestinal pelos esporos requer reinoculação constante, já que a população dessas bactérias é reduzida após 24 horas da suplementação (HOA et al., 2000). Assim, como não colonizam o trato gastrointestinal, podem continuar atuando nas fezes após serem excretadas, fato interessante para os tutores que desejam fezes com odor menos fétido.

A germinação de esporos (evento que resulta na perda de suas propriedades específicas) é um processo essencialmente biofísico. Devido ao fato de ocorrer sem necessidade de nova síntese macromolecular, o aparelho necessário já está presente no esporo adormecido maduro. Os esporos são desidratados e quando ingeridos, ao serem expostos a nutrientes específicos (como um aminoácido, açúcar ou nucleosídeo, água, por exemplo), irão germinar no intestino delgado, num processo que leva apenas alguns minutos, permitindo que a água entre no esporo, resultando na retomada do seu crescimento celular vegetativo (MOIR, 2006).

## 2.5 *BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Os *Bacillus licheniformis* estão distribuídos na natureza, sendo considerados microrganismos de solo. São encontrados associados principalmente às plantas e



materiais de plantas, seus endósporos são disseminados com a poeira (VEITH et al., 2004).

Os *Bacillus subtilis* também podem ser frequentemente isolados no solo (MAZZA, 1994). Essa espécie tem sido utilizada na bacterioterapia oral e bacterioprophylaxia de distúrbios intestinais. A ingestão de quantidades significantes de *Bacillus subtilis* restabelece a microbiota normal, principalmente após uso prolongado de antibióticos ou em condições de prevalência de diarreia (HOA et al., 2000).

A administração de *Bacillus subtilis* em cães aumentou a consistência fecal e reduziu as concentrações de amônia (FÉLIX et al., 2010). O mesmo probiótico foi suplementado em cães filhotes com diarreia e PAAP et al. (2016) observaram melhoria no quadro clínico e redução no odor das fezes.

A suplementação com a associação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* diminuiu o escore de diarreia de leitões e reduziu a mortalidade pré-desmame (ALEXOPOULOS et al., 2004). A partir destas informações, há evidências de que os probióticos representam alternativa para melhorar a saúde, o bem-estar de animais de companhia. Não foram encontrados estudos com a utilização de *Bacillus licheniformis* em cães, o que demonstra a importância da realização de futuros trabalhos.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na dieta de cães pode apresentar efeitos benéficos à funcionalidade intestinal por meio da modulação da microbiota, estimulando o desenvolvimento de microrganismos considerados benéficos. O que se reflete em vários parâmetros considerados importantes para saúde e bem-estar dos animais, como as características fecais, prevenção de doenças.

O fornecimento de uma alimentação nutricionalmente balanceada – produzida com ingredientes de qualidade, aliada a eubiose intestinal, além de contribuir para a manutenção da saúde do animal, refletem nas características fecais, como por exemplo, na formação de fezes menos volumosas, mais consistentes e menos fétidas.

Esses fatores são relevantes para os tutores, que buscam alimentos que resultem em fezes com pouco odor e melhor consistência, para facilitar sua higienização, haja vista, que cada vez mais os cães estão vivendo dentro das casas. Trabalhos com o intuito de elucidar o modo de ação dos probióticos no organismo dos animais e para estabelecer a inclusão desses aditivos nos alimentos comerciais, devem ser realizados.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.; GEORGOULAKIS, I.E.; TZIVARA, A.; KYRIAKIS, C.S.; GOVARIS, A.; KYRIAKIS, S.C. Field evaluation of the effect of a probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 51, n. 6, p. 306-312, 2004.

ALEXANDER, C.; SWANSON, K. S.; FAHEY JR, G. C.; GARLEB, K. A. Perspective: Physiologic Importance of Short-Chain Fatty Acids from Nondigestible Carbohydrate Fermentation. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 576-589, 2019.

BARRY, K. A.; WOJCICKI, B. J.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER, B. M.; SWANSON, K. S.; FAHEY, G. C.; Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 9, p. 2978-2987, 2010.

BIOURGE, V.; VALLET, C.; LEVESQUE, A.; SERGHERAERT, R.; CHEVALIER, S.; ROBERTON, J. L. The use of probiotics in the diet of dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2730–732, 1998.

BONE, E.; TAMM, A.; HILL, M. The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 29, p. 1448–1454, 1976.

BJERRUM, L.; ENGBERG, R. M.; LESER, T. D.; JENSEN, B. B.; FINSTER, K.; PEDERSEN, K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1151-1164, 2006.

BOSCH, G.; PELLIKAAN, W. F.; RUTTEN, P. G. P.; VAN DER POEL, A. F. B.; VERSTEGEN, M. W. A.; HENDRIKS, W. H. Comparative in vitro fermentation activity

in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources.

**Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 2979-2989, 2008.

VAINSHTEIN, M. Probiotics for Environmental Sanitation: Goals and Examples.

**Current Environmental Issues and Challenges**, p. 127-135, 2014.

CASULA, G.; CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2344-2352, 2002.

CELI, P.; VERLHAC, V.; CALVO, E. P.; SCHMEISSER, J.; KLUENTER, A. M. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 9-31, 2019.

COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary pharmacology e Therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 499-507, 1998.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e Resposta Imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

COSTA, M. P.; RODRIGUES, B. L.; FRASÃO, B. S.; CONTE, C. A. Aminas Biogênicas como Índice de Qualidade Alimentar e Risco Químico para Consumo Humano. *Qualidade Alimentar: Equilibrando Saúde e Doença*, p. 75–108, 2018.

DAVILA, A. M.; BLACHIER, F.; GOTTELAND, M.; ANDRIAMIHAJA, M.; BENETTI, P. H.; SANZ, Y.; TOMÉ, D. Re-impressão do "metabolismo do nitrogênio luminal intestinal: papel da microbiota intestinal e consequências para o hospedeiro". **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 114-126, 2013.

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 117-126, 2003.

FELICIANO, M. A. R. **Suplementação de probiótico para cães da raça beagles recebendo alimentos comerciais**. 110p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

FÉLIX, A. P.; NETTO, M. V. T.; MURAKAMI, F. Y.; BRITO, C. B. M. D.; OLIVEIRA, S. G. D.; MAIORKA, A. Digestibility and fecal characteristics of dogs fed with *Bacillus subtilis* in diet. **Revista Ciência Rural**, n. 40, v. 10, p. 2169-2173, 2010.

FÉLIX, A. P. **Avaliação de aditivos sobre as características das fezes de cães**. Universidade Federal do Paraná. 84p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 2009.

FULLER, R. Probióticos no homem e nos animais. **Journal of Applied Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. Simpósio técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição, v. 5, p. 6-28, 2004.

FERNANDES, P. C. C.; SILVA, A. V.; RODRIGUEZ, N. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de cães. Disponível em: <http://www.vetnil.com.br/idiomas/wp-content/uploads/2012/05/viabilidade.pdf>.

GIL-TURNES, C.; SANTOS, A. F. D.; CRUZ, F. W. D.; MONTEIRO, A. V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 11-14, 1999.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of *lactobacilli* in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p.480-487, 2010.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.

HAMER, H. M.; PRETER, V.; WINDEY, K.; VERBEKE, K. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 1, p. G1-G9, 2011.

HENDRIKS, W. H.; VAN, BAAL, J.; BOSCH, G. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants – a comparative species viem. **The British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. 247-257, 2012.

HERSCHEL, D. A.; ARGENZIO, R. A.; SOUTHWORTH, M.; STEVENS, C. E. Absorption of volatile fatty acid, Na, and H<sub>2</sub>O by the colon of the dog. **American Journal of Veterinary Research**, n. 42, p. 1118–1124, 1981.

HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P. H.; AMMENDOLA, S.; CUTTING, S. M. Caracterização de espécies de *Bacillus* utilizadas para bacterioterapia oral e bacterioprolifaxia de desordens gastrintestinais. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5241-5247, 2000.

HUSSEIN, H. S.; FLICKINGER, E. A.; FAHEY, G. C. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1454-1456, 1999.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KNARREBORG, A.; SIMON, M. A.; ENGBERG, M. R.; JENSEN, B. B.; TANNOCK, G. W. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of Broiler Chickens at Various Ages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5918-5924, 2002.

LAPARRA, J. M; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 219–225, 2010.

LEE, W. J.; HASE, K. Os metabólitos gerados pela microbiota intestinal na saúde e na doença dos animais. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 416, 2014.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probióticos: fatores promotores de crescimento produzidos por microorganismos. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LIN, H. C.; VISEK, W. J. Danos celulares na mucosa do cólon por amônia em ratos. **The Journal of nutrition**, v. 121, n. 6, p. 887-893, 1991.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*, p. 51–92, 1991.

MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, n. 133, p. 3–18, 1994.

MOIR, A. How do spores germinate? **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 526–30, 2006.

MORTENSEN, P. B.; HOLTUG, K.; BONNEN, H.; CLAUSEN, M. R. The degradation of amino acids, proteins, and blood to short-chain fatty acids in colon is prevented by lactulose. **Gastroenterology**, v. 98, n. 2, p. 353–360, 1990.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistência dos endosporos de *Bacillus* a ambientes extremos terrestres e extraterrestres. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

NOWAK, A.; LIBUDZISZ, Z. Influence of phenol, p-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactic acid bacteria. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 80–84, 2006.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. National Academy Press: Washington, DC, USA. 2006, 426p.

PAAP, P. M.; VAN DER LAAK, J. H.; SMIT, J. I.; NAKAMURA, N.; BEYNEN, A. C. Administration of *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) may improve feces consistency in dogs with chronic diarrhea. *Pareceres de pesquisa em ciências animais e veterinárias*, v. 6, n. 8, p. 256-260, 2016.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PEREIRA, K. D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 88-92, 2007.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Muller and Kirks Small Animal Dermatology, sixth ed. Philadelphia, Saunders, p. 615–624, 2001.

SANTOS, M. H. Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, Espanha, jun. 1996.

SHALABY, A. R. Significado das aminas biogênicas para a segurança alimentar e saúde humana. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.



SIMPSON, J. W. Dieta e doença do intestino grosso em cães e gatos. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2717S-2722S, 1998.

SNEATH, P. H. A. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2, p. 1104- 1207, 1986.

SOUTO, G. I.; CORREA, O. S.; MONTECCHIA, M. S.; KERBER, N. L.; PUCHEU, N. L.; BACHUR, M.; GARCIA, A. F. Caracterização genética e funcional de *Bacillus* sp. surfactina excretadora de estirpes e metabólitos antifúngicos parcialmente identificados como compostos do tipo iturina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1247-1256, 2004.

SPANO, G.; RUSSO, P.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; COTON, E.; COTON, M.; BARNAVON, L. Biogenic amines in fermented foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, n. 64, p. S95-S100, 2010.

SUCHODOLSKI, J. S. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 520-1530, 2011.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; FAHEY, G. C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 5, n. 132, p. 980–989. 2002.

TUOHY, K. M.; PINART, P. G.; JONES, M.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. **Journal of applied microbiology**, v. 102, p. 1026-1032, 2007.

VEITH, B.; HERZBERG, C.; STECKEL, S.; FEESCHE, J.; MAURER, K. H.; EHRENREICH, P.; EHRENREICH, A. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* an organism with great industrial potential. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 204-211, 2004.

VITKOVIĆ, L.; SADOFF, H. L. Purificação da protease extracelular de *Bacillus licheniformis* e sua inibição pela bacitracina. **Jornal de Bacteriologia**, v. 131, n. 3, p. 891-896, 1977.

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T.; BALLEVRE, O.; ROCHAT, F. Dietary effects on *bifidobacteria* and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 87, n. 11-12, p. 397-407, 2003.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL, B. L. Z. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 2, n. 73, p. 451-455. 2001.

Artigo redigido de acordo com as normas da Revista BMC Veterinary Research.

***Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs**

Tais Silvino Bastos<sup>1\*</sup>, Daniele Cristina de Lima<sup>1</sup>, Camilla Mariane Menezes Souza<sup>1</sup>,  
Alex Maiorka<sup>1</sup>, Simone Gisele de Oliveira<sup>1</sup>, Letícia Cardoso Bittencourt<sup>2</sup>, Ananda  
Portella Félix<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

<sup>2</sup>DSM, São Paulo, SP, Brazil.

## Abstract

**Background:** Direct-fed microbials (DFM), such as *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, may improve gut functionality of the host by favouring non-pathogenic bacteria and reducing the formation of putrefactive compounds. The aim of this study was to assess the nutrient digestibility, faecal characteristics and intestinal-fermentation products in dogs fed diets with *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Sixteen dogs were randomly divided into two groups. Every eight dogs were fed with the control diet or the diet with the addition of 62.5 g of DFM (*B. subtilis* and *B. licheniformis*)/ton. Diets were provided throughout a twenty-day adaptation period, followed by five days of total faecal collection. Nutrient digestibility and the metabolisable energy of the diets, plus the dogs' faecal characteristics and intestinal fermentation products were assessed.

**Results:** There were no differences in nutrient digestibility ( $P > 0.05$ ). However, DFM supplementation improved faecal score and resulted in less fetid faeces ( $P < 0.001$ ). DFM inclusion reduced ( $P < 0.05$ ) the biogenic amines concentration: putrescine, spermidine and cadaverine, besides the concentration of phenols and quinoline.

**Conclusions:** The use of *B. subtilis* and *B. licheniformis* as DFM reduce the concentration of nitrogen fermentation products in faeces and faecal odour, but the digestibility of nutrients is not altered in dogs.

**Keywords:** Biogenic amines, Direct-fed microbials, Faecal consistency, Intestinal functionality

## Background

Many complete dog foods have a high protein content in their formulations, which can result in high concentrations of undigested nitrogen compounds in the large intestine, leading to the formation of putrefactive compounds. These compounds include ammonia, biogenic amines, branched-chain fatty acids, sulphidric gas, phenols and indoles [1]. Some of these catabolites can negatively affect intestinal functionality, contributing to inflammatory processes, such as colitis and colon carcinogenesis, as well as the worsening of dogs' faecal odour [1, 2]. Furthermore, the increase in the non-digestible-protein flow that reaches the colon provides fermentation substrates to organisms with pathogenic potential, such as *Clostridium*, *Salmonella* and *Escherichia* species [3, 4], and can contribute to dysbiosis, an imbalance of the intestinal microbiota.

Thus, the search for nutritional strategies, such as the use of direct-fed microbials (DFM) to improve dogs' intestinal functionality and faecal quality is extremely relevant. DFM has been defined by the US Food and Drug Administration as the feed product containing the source of naturally-existing live microbes, like some bacteria of the *Bacillus* genus. When supplemented in the diet, these microorganisms may favour non-pathogenic bacteria [5, 6].

Bacteria of the *Bacillus* genus, such as the facultative anaerobic species *B. subtilis* and *B. licheniformis*, have the advantage of sporulation. This characteristic makes them more viable in food and resistant to acidic gastric pH [6, 7, 8]. *B. subtilis* and *B. licheniformis* are commonly found as spores in the soil. The spores are dehydrated and when exposed to appropriate nutrients and moisture will germinate in the small intestine, resuming their cell vegetative growth [9]. After being excreted, these organisms can sporulate again in faeces [7, 10].

Studies have shown that *B. subtilis* and *B. licheniformis* can improve faecal odour and reduce gas formation in the intestine of dogs [11], prevent necrotic enteritis in broilers [12], and reduce diarrhoea in piglets [13]. Since they are viable after excretion, these organisms degrade organic matter in the faeces, reduce ammonia production [4] and potentially reduce faecal odour. Given the above, the aim of the present study was to evaluate diet digestibility, faecal characteristics and intestinal fermentation products in dogs supplemented with DFM *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*.

## Results

All dogs remained healthy throughout the experiment. No episodes of vomiting or diarrhoea were observed. No differences in DM intake (Control =  $201.2 \pm 4.33$  g/day and DFM =  $204.1 \pm 5.34$  g/day) and body weight (Control =  $10.2 \pm 1.04$  kg and DFM =  $10.5 \pm 1.08$  kg) were observed between treatments ( $P > 0.05$ ).

The inclusion of DFM with *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in extruded dog diets did not alter ( $P > 0.05$ ) the nutrient apparent total tract digestibility (ATTD) coefficients and diet metabolisable energy (ME) (Table 1), faecal DM, ammonia, faecal pH, and sialic acid (Table 2), as well as the SCFA and BCFA concentrations in the faeces (Table 3). The faecal score, however, was increased and the inclusion of DFM resulted in less fetid faeces both in fresh samples and 6 hours after defecation ( $P < 0.05$ , Table 4 and Figure 1). According to 82% of the evaluators, fresh faeces of dogs consuming the DFM diet were less fetid than those from animals consuming the control diet. Similarly, 78% of evaluators considered that 6 hours after defecation the faeces of dogs consuming DFM were less fetid than those in the control group ( $P < 0.05$ , Figure 1). The concentration of biogenic amines:

*putrescine*, spermidine and cadaverine, as well as phenols and quinoline were reduced ( $P < 0.05$ ) with the inclusion of DFM (Tables 5 and 6).

**Table 1** Diet ATTD and ME means with or without DFM (n=8).

Item	Control	DFM	SEM	<i>P-value</i>
ATTD (%)				
Dry matter	79.1	78.8	0.31	0.739
Organic matter	84.1	83.8	0.25	0.754
Crude protein	79.9	78.8	0.56	0.281
Ether extract	86.5	85.6	0.42	0.297
Ash	43.9	44.2	0.45	0.921
Nitrogen-free extract	92.9	92.1	0.67	0.892
ME (kcal/kg)	4034.9	4062.4	10.49	0.199

*ATTD* Apparent total tract digestibility, *ME* Metabolisable energy

*DFM* Direct-fed microbials (62.5 mg/kg of diet of a mixture of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus subtilis* and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus licheniformis*)

**Table 2** Faecal characteristics means of dogs fed diets with or without DFM (n=8).

Item	Control	DFM	SEM	<i>P-value</i>
Fresh faeces pH	6.32	6.50	0.058	0.128
After 6 hours pH	6.32	6.31	0.035	0.933
Fresh faeces moisture (%)	70.04	69.12	0.563	0.434
After 6 hours moisture (%)	67.39	67.36	0.707	0.981
Fresh faeces ammonia (g/kg)	0.52	0.50	0.001	0.834
After 6 hours ammonia (g/kg)	0.73	0.61	0.001	0.897
Faecal production	0.13	0.12	0.005	0.379
Sialic acid (μmol/g)	2.46	2.47	0.04	0.943

*DFM* Direct-fed microbials (62.5 mg/kg of diet of a mixture of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus subtilis* and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus licheniformis*)



**Table 3** SCFA and BCFA means in faeces of dogs fed diets with or without DFM (n=8).

Item	Control	DFM	SEM	<i>P-value</i>
SCFA (μmol/g)				
Acetic	31.21	33.79	1.118	0.263
Propionic	27.66	27.16	1.205	0.845
Butyric	4.78	3.94	0.316	0.193
Total SCFA	64.33	64.89	1.899	0.887
BCFA (μmol/g)				
Isobutyric	0.79	0.91	0.035	0.090
Isovaleric	0.78	0.67	0.044	0.198
Valeric	0.29	0.31	0.011	0.415
Total BCFA	1.94	1.87	0.065	0.640

SCFA short chain fatty acids, BCFA branched chain fatty acids.

DFM Direct-fed microbials (62.5 mg/kg of diet of a mixture of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus subtilis* and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus licheniformis*).

**Table 4** Faecal score, odour medians and interquartiles of dogs fed diets with or without DFM.

Item	Control	DFM	<i>P-value</i>
Faecal score	4 (3/4)	4 (4/4)	<0.001
Odour fresh faeces	2 (2.0/2.0)	1 (1.0/1.0)	<0.001
Odour after 6 h	2 (2.0/2.0)	1 (1.0/1.0)	<0.001

*Faecal score* (n=8) 1 (liquid stools) to 5 (dry stools); *faecal odour* (n=50) 1 (less fetid than control) 2 (same as control) and 3 (more fetid than control).

*DFM* (Direct-fed microbials) (62.5 mg/kg of diet of a mixture of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus subtilis* and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus licheniformis*).

**Table 5** Biogenic amines (mg/kg) means in faeces of dogs fed diets with or without DFM (n=8).

Item	Control	DFM	SEM	<i>P-value</i>
Tiramine	48.36	46.22	10.770	0.443
Putrescine	71.24	47.51	9.321	0.025
Cadaverine	129.87	88.63	18.935	0.050
Histamine	22.93	23.89	5.280	0.448
Serotonin	3.20	2.39	0.381	0.057
Agmatine	0.00	0.00	0.000	1.000
Spermidine	26.77	19.94	2.451	0.015
Phenylethynamie	0.55	0.92	0.253	0.147
Tryptamine	0.51	0.22	0.344	0.272
Total amines	303.42	209.90	38.301	0.031

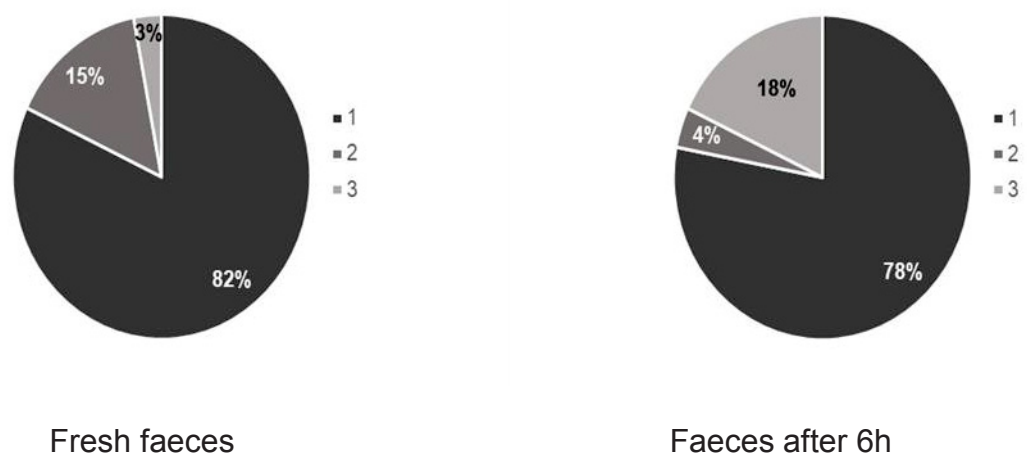
*DFM* Direct-fed microbials (62.5 mg/kg of diet of a mixture of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus subtilis* and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus licheniformis*)

**Table 6** Mean percentage of peak areas of more abundant volatile organic compounds present in the dogs' faeces (n=8).

	Item	Control	DFM	SEM	<i>P-value</i>
Fresh faeces	Phenols	37.18	18.96	3.13	<0.001
	Quinoline	14.57	3.06	3.14	<0.001
	Indoles	63.32	67.08	2.98	0.548
After 6 hours	Phenols	33.48	34.58	2.86	0.855
	Quinoline	7.68	7.33	1.85	0.927
	Indoles	58.83	58.04	3.98	0.929

DFM (Direct-fed microbials) (62.5 mg/kg of diet of a mixture of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus subtilis* and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus licheniformis*)

**Figure 1** Points frequency of faecal odour scores attributed by evaluators ( $n = 50$ ). 1 = less fetid odour; 2 = same odour and 3 = more fetid odour, as compared to faeces of dogs fed the control diet.



## Discussion

This study demonstrates that dietary DFM supplementation reduced the concentration of protein fermentation compounds in faeces, resulting in lower faecal odour of dogs. However, it did not change diet digestibility.

The absence of DFM effects on diet digestibility components was similar to that observed by Biourge [14] and Pasupathy [15]. The authors found no difference in the digestibility of dog diets containing  $7.5 \times 10^6$  cfu of *Bacillus CIP 5832* and  $2 \times 10^7$  cfu of *Lactobacillus acidophilus*.

Besides nutrient digestibility, faecal characteristics should also be taken into consideration in dog-food evaluations. Faecal characteristics can be a reflex of intestinal functionality and have become more relevant for pet owners that look for dog foods that reduce faecal odour and improve faecal consistency. When compared to the control diet, the effect of DFM was reflected by an improvement in faecal consistency. These results were also reported by Félix et al. [6], using a 0.01% supplement of *Bacillus subtilis* (C-3102) and Paap et al. [11], using 0.5g/100g *Bacillus subtilis* (C-3102) in diets for dogs. Similarly, when supplement in diet *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, Alexopoulos et al. [13] reported a diarrhoea reduction in piglets.

The maintenance of intestinal eubiosis plus SCFA production in the colon can explain the increase in faecal consistency [16] with the use of probiotics and DFM in the diet. SCFA production by intestinal microorganisms and their absorption by the colonocytes stimulate water and electrolyte absorption, as well as increase the absorption rate of sodium, responsible for most of the water absorbed in the intestinal lumen [17]. Despite this, faecal SCFA concentration was not altered in the present

study with the use of DFM. This may be due to the rapid absorption rate of SCFA by the intestinal mucosa [1, 18].

Likewise, no changes were observed in dogs' faecal pH, in agreement with what has been reported by Swanson et al. [1], Félix et al. [6], and Stercova et al. [19]. On the other hand, Feliciano et al. [5] observed a reduction in faecal pH of dogs fed a diet containing *Lactobacillus* spp. The absence of faecal pH alterations of dogs fed with *Bacillus* spp. can be due to the limited ability of the *Bacillus* genus species to produce lactic acid when compared to *Lactobacillus* [6].

Amino acid fermentation catabolites are considered to be the main odoriferous components of faeces and can have negative influences on intestinal functionality due to their toxicity and their favouring the survival of bacteria with pathogenic potential [20, 21, 22]. Several putrefactive compounds can be produced from the fermentation of undigested amino acids by deamination, deamination-decarboxylation or carboxylation [23], with ammonia, biogenic amines, BCFA, indoles, phenols, and volatile compounds containing sulphur being the major groups [22, 23].

In the present study, DFM supplementation decreased the concentration of potentially toxic putrefactive compounds for the intestinal mucosa when in high concentrations. The reduced compounds were: putrescine, spermidine, cadaverine, phenols, and quinoline, which resulted in faeces with less odour, both when fresh and 6 hours after defecation.

Besides these results, the faecal ammonia concentration was not reduced in dogs fed the diet containing DFM. Likewise, other studies did not report a same pattern among the increase or decrease of all protein catabolites [1, 3, 24]. This may be explained by the different nitrogen substrates that generate these catabolites and

their different utilization rates by the gut microbiota. Ammonia is produced by deamination, while biogenic amines, phenols, and indoles are produced by the decarboxylation of amino acids. The amine putrescine, spermidine and cadaverine are produced from the decarboxylation of ornithine, methionine and lysine, respectively [25]. Phenols and indoles are produced from the fermentation of tyrosine and tryptophan, respectively [26]. Since these mechanisms are mediated by enzymes produced mainly by intestinal bacteria with pathogenic potential, it is possible that DFM influenced the intestinal microbiota, favouring the non-pathogenic bacterial population.

The fact that the odour was still low 6 hours after defecation (simulating what usually happens in the home environment) indicates that *B. subtilis* and *B. licheniformis* have a continuous action in faeces after excretion. According to Vainshtein et al. [4], spore-forming *Bacillus* species produce substances that are antagonists to the development of organisms with pathogenic potential (generally proteolytic) and produce enzymes that degrade OM present in the excreta, reducing ammonia production. These effects can occur both in the gut and the faeces. Still according to these authors, *Bacillus*-genus bacteria have shown major results in sanitizing poultry and swine waste.

Another mechanism that may have contributed to the intestinal microbiota balance could be the immunomodulatory action of *B. subtilis* and *B. licheniformis* in the gut [27], reducing the establishment of organisms with pathogenic potential, protecting the villi and the absorption surface against irritating toxins [28], such as biogenic amines, phenols and indoles. In a study with broilers, Knap et al. [12] observed that the use of *Bacillus licheniformis* in the diet helped prevent necrotic enteritis.

Considering the discussion above, dietary supplementation with DFM *B. subtilis* and *B. licheniformis* has potential beneficial effects in gut functionality in dogs. To our knowledge, this was the first study to describe the reduction on biogenic amines, phenols, and quinoline in faeces of dogs fed DFM. Besides, the reduction of the faecal odour and improvement in the faecal score are very important commercial characteristics, considering the close relation between dogs and their owners. Different from conventional probiotics, these DFM may be more effective in reaching the colon, considering their ability to form spores and resist to environment and gastric pH levels [7, 8]. These characteristics make DFM very interesting for practical applications in commercial dog diets.

Despite these potential benefits, one limitation of the present study was that we did not evaluate the faecal microbiota of dogs. Besides, although many studies report the toxic effects of higher concentrations of nitrogen fermentative products to colonocytes [20, 21, 22], we still have a lack of information of which is the limit between the functional and toxic concentrations of these compounds in the gut mucosa of dogs. This is important considering that dogs have greater protein requirements than humans and it was previously reported that the modulation of some polyamines is important to reduce inflammatory processes and cell infiltrations in dogs with inflammatory bowel disease and colonic polyps [29]. Thus, further studies evaluating the effects of DFM supplementation in faecal microbiota and nitrogen fermentative products in dogs are required to better understand their effects on intestinal functionality and the modulation of dogs' intestinal microbiota.



## Conclusions

The inclusion of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg of *Bacillus subtilis* feed and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg of *Bacillus licheniformis* feed in extruded dog diets improves faecal consistency and odour. It also reduces faecal concentration of compounds produced in protein catabolism such as putrescine, spermidine, cadaverine, phenols, and quinoline, demonstrating possible beneficial effects on dog's intestinal functionality.

## Methods

### Animals and housing

Sixteen adult intact beagle dogs were used (eight males and eight females), with an average body weight of  $10.3 \pm 1.07$  kg and four years of age. All animals underwent previous clinical and physical examinations, were vaccinated, dewormed, and individually housed in covered brickwork kennels (5 meters long x 2 meters wide), containing a bed and free access to fresh water. The environment temperature ranged from 16 °C to 28 °C with a 12-h light–dark cycle (light 6 am–6 pm). All animals were brought to the Research laboratory on canine nutrition of the Federal University of Parana (Curitiba, PR, Brazil) from Maiorca Kennel (Colombo, PR, Brazil) when they were 3–4 months old.

During most of the diet adaptation period (until the 16<sup>th</sup> day) dogs had free supervised access to an outdoor area for 2h a day. Between days 17–25 the dogs were individually housed at the kennels to allow for faecal collection. All dogs received extra attention and kennel enrichment during this period. The dogs will be donated when they complete 6 years of age. The use of animals for this study was

approved by the Ethics Committee on Animal Use from the Agrarian Sciences Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil (012/2019).

### **Experimental diets**

The same commercial diet for adult dogs was divided into two parts and used in the experimental treatments. One part (eight dogs, four males and four females) was used in the control treatment, with no DFM supplementation, and the other part (eight dogs, four males and four females) was used as the test treatment containing 62.5 mg/kg of a diet with a mixture of *Bacillus subtilis* ( $3.66 \times 10^7$  cfu/kg of the diet) and *Bacillus licheniformis* ( $3.66 \times 10^7$  cfu/kg of the diet) as DFM (PureGro®, DSM, Heerlen Netherlands). The diet had the following composition: poultry viscera meal, meat meal, corn, soybean meal, poultry fat, swine liver hydrolysate, sodium chloride, citric acid, antioxidants (BHT, BHA), propionic acid, vitamin A, vitamin D3, vitamin E, vitamin B1, vitamin B6, vitamin B12, vitamin K3, nicotinic acid, folic acid, biotin, calcium pantothenate, zinc sulfate, calcium iodate, sodium selenite, copper sulfate, iron sulfate, manganese sulfate and zinc oxide. The chemical composition of the experimental diets is shown in (Table 7).

DFM was diluted in poultry viscera oil and used on top of the test diet. The same amount of oil, without DFM, was used on the control treatment, ensuring that the diets were isonutritive.

**Table 7** Analysed chemical composition of the experimental diets (dry matter basis, %).

Item	Control	DFM
Dry matter	91.77	91.51
Crude protein	21.75	21.12
Ether extract in acid hydrolysis	9.22	9.04
Ash	7.02	7.00
Crude fibre	2.23	2.42
Calcium	1.18	1.23
Phosphorus	0.89	0.91

*DFM* Direct-fed microbials (62.5 mg/kg of a diet with a mixture of  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg *Bacillus subtilis* and  $3.66 \times 10^7$  cfu/kg of *Bacillus licheniformis*)

### Experimental procedures

The digestibility assay followed the total faeces collection method as recommended by the Association of American Feed Control Official [30]. The diets were provided during a twenty-day adaptation period, followed by five days of total faeces collection, resulting in a mixture of faeces from each animal.

The food was provided twice a day (8:30 a.m. and 4:00 p.m.), in amounts sufficient to meet the animal's metabolisable energy (ME) requirement according to the National Research Council [31], where:  $ME \text{ (kcal/day)} = 130 \times \text{Body weight}^{0.75}$ . Water was provided *ad libitum*. The faeces were collected and weighed at least two times per day and stored in individual previously-identified plastic containers, covered and stored in a freezer (-14°C) to be analysed later.

At the end of the collection period, the faeces of each replicate were thawed at room temperature and homogenized separately, forming a composite sample from each animal. Faeces were dried in a forced ventilation oven (320-SE, Fanem, São Paulo, Brazil) at 55°C for 48 hours or until reaching constant weight. Diets and faeces were ground to 1.0 mm in a hammer mill (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA), using 1.0-mm wire mesh sieves for the bromatological testing (in duplicate and with repetitions when the variation was higher than 5%).

The amounts of dry matter at 105°C (DM105), crude protein (CP, method 954.01), crude fibre (CF, method 994.13), ether extract in acid hydrolysis (EEAH, method 954.02), and ash (942.05) were determined in both diets and faeces according to the Association of the Official Analytical Chemists [32]. The amount of gross energy (GE) was established using a calorimetric pump (Parr Instrument Co., model 1261, Moline, IL, USA), and organic matter (OM) was calculated by the difference between 100 – Ash. Nitrogen-free extract was calculated as 100 – CP – Ash – CF – EEAH.

Faecal characteristics were assessed at the end of the study by analysing the total amount of dry faecal matter (DMf), faeces production (g faeces/g DM intake/5 days), consistency score and odour, pH, ammonia concentration, short-chain fatty acids (SCFA), branched-chain fatty acids (BCFA), phenols, indoles, sialic acid, and biogenic amines.

Considering that the faecal-consistency scoring system is a subjective evaluation, the sample was always evaluated by the same researcher using a 5-point rating scale: 1 = faeces are soft and have no defined shape; 2 = faeces are soft and poorly formed; 3 = faeces are soft, formed and moist; 4 = faeces are well formed and consistent; 5 = faeces are well formed, hard and dry, according to Carciofi [33].

Faecal odour was evaluated and scored on the 25<sup>th</sup> day of the experimental period. Faeces from three animals per treatment were randomly collected, homogenized and the same amounts (5.0 g) were placed in plastic containers of the same size and covered with plastic film with holes (same number and size). The containers were classified as: A (control diet) and B (DFM diet), so the participants would not have information about the treatment. The sensorial analysis was performed by 50 evaluators with fresh faeces (up to 30 minutes after defecation) and six hours after defecation, with different people at each point in time. In the evaluation, sample B with DFM was compared to A (control diet) using the following scoring system: 1 = better odour than control (less fetid); 2 = same as control; 3 = worse than control (more fetid).

Faecal pH and ammonia concentrations were analysed in faeces collected up to 15 minutes after defecation. Faecal pH was measured in a digital pH meter (331, Politeste Instrumentos de Teste Ltda, São Paulo, SP, Brazil) using 3.0 g of fresh faeces diluted in 30 mL of distilled water. The ammonia concentration was determined according to the method described by Brito et al. [34].

Fresh faeces collected up to 15 minutes after defecation were used to determine SCFA and BCFA. A properly labelled plastic container with a lid was used to weigh 10 g of faeces mixed with 30 mL of 16% formic acid. This mixture was homogenized and stored at 4°C for 3 to 5 days. Before the analysis, these solutions were centrifuged at 5000 rpm (2K15 centrifuge, Sigma, Osterode am Harz, Germany) for 15 minutes. At the end, the supernatant was separated and centrifuged. Each sample underwent three centrifugations and, at the end of the last one, part of the supernatant was transferred to a properly identified eppendorf for subsequent freezing. Later on, the samples were thawed and centrifuged again at 14000 rpm for

15 minutes (Rotanta 460 Robotic, Hettich, Tuttlingen, Germany). Faecal SCFA and BCFA were determined by gas chromatography (Shimadzu®, model GC-2014, Kyoto, Japan) using a 30-m long and 0.32-mm wide glass column (Agilent Tecnologias, HP INNO cera-19091N, Santa Clara, USA). Nitrogen was used as the carrier gas at a 3.18 mL/min flow rate. Working temperatures were 200°C at injection, 240°C in the column (at a 20°C/min rate), and 250°C in the flame ionization detector.

Phenols and indoles were analysed by chromatography using a GCMS2010 Plus gas chromatographer (Shimadzu®) coupled to a TQ8040 mass spectrometer with an AC 5000 autosampler and a split-splitless injector. Chromatographic separations were obtained in the SH-Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm - Shimadzu®) column with a 1.0-mL min<sup>-1</sup> flow rate, and helium as the drag gas at a 5.0 rate. The transfer line and ionization source temperatures were maintained at 40°C and 220°C, respectively, with the 1-µL injection volume in the split mode (1:10 rate). The GC oven temperature was maintained at 220°C (5 min) with a 40°C/min<sup>-1</sup> increase to 280°C (5 min). Total analysis time was 31 minutes and the mass spectrometer operated in the full scan modes ( $m/z$  = 40 to 400) and selective ion monitoring (SIM), with electron ionization at 70 eV. GCMSsolution® was the software used in the data analysis.

For the sialic acid determination, faeces were lyophilized (Alpha 1-4 LO plus, Christ, Osterode am Harz, Germany) and analysed according to the method described by Jourdain et al. [35]. Biogenic amines were analysed according to the method described by Urrego et al. [36] in fresh faeces, collected up to 15 minutes after defecation.

The DMf, consistency score, faecal odour, pH, ammonia, phenols and indoles were also analysed in the same samples 6 hours after defecation. For the analysis

performed 6 hours after defecation, faeces were maintained at room temperature (average of 24.5°C, 84% relative air humidity and in the shade for 6 hours.)

### **Calculations and Statistical analyses**

Based on the laboratory results, the apparent total tract digestibility (ATTD) coefficients and the diet's ME were calculated according to the Association of American Feed Control Official [30]:

$$\text{ATTD\%} = [(g \text{ of nutrient intake} - g \text{ of nutrient excretion}) / g \text{ of nutrient intake}] \times 100.$$

$$\text{ME (kcal/g)} = \{ \text{kcal/g GE intake} - \text{kcal/g GE faecal excretion} - [ (g \text{ CP intake} - g \text{ CP faecal excretion}) \times 1.25 \text{ kcal/g} ] \} / g \text{ of feed intake}.$$

The experiment had a completely randomized design with two treatments, each one with eight replicates, except for faecal odour that had 50 replicates. Each dog was considered an experimental unit. The Shapiro-Wilk test was used to determine normality of the data and the homoscedasticity of variances was analysed by Bartlett's test. When these assumptions were met, the t-Student's test was used at a 5% significance level. The non-parametric data were analysed by the Mann-Whitney-Wilcoxon test ( $P < 0.05$ ). The frequency of faecal odour scores was analysed by the chi-square test ( $P < 0.05$ ).

### **Abbreviations**

DFM: Direct-fed microbials; ME: metabolisable energy; CP: crude protein; EEAH: ether extract in acid hydrolysis; DM: dry matter; DMf: dry faecal matter; GE: gross energy amount; OM: organic matter; SCFA: short-chain fatty acids; BCFA: branched-chain fatty acids; ATTD: apparent total tract digestibility coefficients.

**Declarations****Ethical approval**

The experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Use from the Agrarian Sciences Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil, under protocol number 012/2019.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Data and materials availability**

All data generated or analysed during this study will be available from the corresponding author upon reasonable previous request and with the permission of the DSM.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Funding**

The project was supported by DSM São Paulo, SP, Brazil. The funding was important to pay for the experimental diets and laboratory analyses but did not interfere in data interpretation and in writing the manuscript.

**Authors contributions**



APF, LCB, SGO and AM designed and supervised the study, carried out data analyses and reviewed the manuscript. DCL, TSB and CMMS conducted the research and carried out laboratory analyses. DCL and TSB interpreted data and wrote the manuscript draft. LCB, assisted in the translation of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements**

The authors thank DSM for supporting the research.

## References

1. Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Healy HP, Dawson KA, Fahey GC. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J Nutr.* 2002; 132: 980–89. <https://doi.org/10.1093/jn/132.5.980>.
  
2. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool BLZ. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73: 451s-55s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.451s>.
  
3. Barry KA, Wojcicki BJ, Middelbos IS, Vester BM, Swanson KS, Fahey GC. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify faecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. *J Anim Sci.* 2010; 88: 2978–87. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2464>.
  
4. Vainshtein M. Probiotics for Environmental Sanitation: Goals and Examples. *Current Environmental Issues and Challenges.* 2014; 127: 35. <https://doi.org/10.1007/BF00264683>.

5. Feliciano MAR, Saad FMOB, Logato PVR, Aquino AA, José VA, Roque NC. Effects of probiotics on digestibility, faecal score, and haematologic characteristics in dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009; 61: 1268–1274. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000600003>.
6. Félix AP, Netto MVT, Murakami FY, Brito CBMD, Oliveira SGD, Maiorka A. Digestibility and faecal characteristics of dogs fed with *Bacillus subtilis* in diet. *Ciênc Rural.* 2010; 40: 2169–73. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000166>.
7. Hoa NT, Baccigalupi L, Huxham A, Smertenko A, Van PH, Ammendola S, Cutting SM. Caracterização de espécies de *Bacillus* utilizadas para bacterioterapia oral e bacterioprolaxia de desordens gastrintestinais. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 5241–47. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5241-5247.2000>.
8. Coppola MDM, Gil-Turnes C. Probiotics and immune response. *Ciênc Rural.* 2004; 34: 1297–1303. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000400056>.
9. Moir A. How do spores germinate?. *J Appl Microbiol.* 2006; 101: 526–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02885.x>.
10. Tam NK, Uyen NQ, Hong HA, Duc LH, Hoa TT, Serra CR, Cutting SM. O ciclo de vida intestinal de *Bacillus subtilis* e parentes próximos. *J Bacteriol.* 2006; 188: 2692–2700. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2692-2700.2006>.

11. Paap PM, Laak VDL, Smit JI, Nakamura N, Beynen AC. Administration of *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) may improve faeces consistency in dogs with chronic diarrhea. *Res Opin Anim Vet Sci.* 2016; 6: 256–60. <https://doi.org/10.20490/ROAVS/16-043>.
12. Knap I, Lund B, Kehlet AB, Hofacre C, Mathis G. *Bacillus licheniformis* prevents necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases.* 2010; 54: 931–35. <https://doi.org/10.1637/9106-101509-ResNote.1>.
13. Alexopoulos C, Georgoulakis IE, Tzivara A, Kyriakis CS, Govaris A, Kyriakis SC. Avaliação de campo do efeito de esporos de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* contendo probióticos sobre o estado de saúde, desempenho e qualidade de carcaça de suínos produtores e suínos. *J Med Vet.* 2004; 51: 306–312. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00637.x>.
14. Biourge V, Vallet C, Levesque A, Sergheraert R, Chevalier S, Robertson JL. The use of probiotics in the diet of dogs. *J Nutr.* 1998; 128: 2730S–32S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2730S>.
15. Pasupathy K, Sahoo A, Pathak NN. Effect of *Lactobacillus* supplementation on growth and nutrient utilization in mongrel pups. *Archiv Fur Tierernaehr.* 2001; 55: 243–253. <https://doi.org/10.1080/17450390109386195>.
16. Suchodolski JS. Diagnóstico e interpretação da disbiose intestinal em cães e gatos. *Vet J.* 2016; 215: 30–7. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>.

17. Guarner F, Malagelada, JR. Flora intestinal na saúde e na doença. The Lancet. 2003; 361: 512–19. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0).
  
18. Von Engelhardt W, Burmester M, Hansen K, Becker G. Unidirectional fluxes of short-chain fatty acids across segments of the large intestine in pig, sheep and pony compared with guinea pig. J Comparative Physiol B. 1995; 165: 29–36. <https://doi.org/10.1007/BF00264683>.
  
19. Stercova E, Kumprechtova D, Auclair E, Novakova J. Effects of live yeast dietary supplementation on nutrient digestibility and faecal microflora in beagle dogs. J Anim Sci. 2016; 94: 2909–18. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0584>.
  
20. Zentek J, Marquart B, Pietrzak T, Ballevre O, Rochat F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. J Anim Physiol Anim Nutr. 2003; 87: 397–407. <https://doi.org/10.1046/j.0931-2439.2003.00451.x>.
  
21. Suchodolski JS. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. J Anim Sci. 2011; 89: 1520–30. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>.

22. Celi P, Verlhac V, Calvo EP, Schmeisser J, Kluenter AM. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Anim Feed Sci Technol.* 2019; 250: 9–31. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.012>.
  
23. Macfarlane GT, Cummings JH. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: Phillips, SF, Pemberton JH, Shorter RG, (Eds.). *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Raven Press, New York, NY; 1991. p. 51–92.
  
24. Peixoto MC, Ribeiro ÉM, Maria APJ, Loureiro BA, Santo LG, Putarov TC, Yoshitoshi FN, Pereira GT, Sá LRM, Carciofi AC. Effect of resistant starch on the intestinal health of old dogs: Fermentation products and histological features of the intestinal mucosa. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018; 102: e111—e121. <https://doi.org/10.1111/jpn.12711>.
  
25. Neis E, Dejong C, Rensen S. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients.* 2015; 7: 2930–46. <https://doi.org/10.3390/nu7042930>.
  
26. Garner CE, Smith S, Lacy CB, White P, Spencer R, Probert CS, Ratcliffe NM. Volatile organic compounds from faeces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *The FASEB J.* 2007; 21: 1675-88. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6927com>.

27. Leser TD, Knarreborg A, Worm J. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. J Appl Microbiol. 2008; 104: 1025–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03633.x>
28. Nicoli JR, Vieira LQ. Probióticos, prebióticos e simbióticos – Moduladores do ecossistema digestivo. Ciênc Hoje. 2000; 28: 34–8.
29. Rossi G, Cerquetella M, Scarpona S, Pengo G, Fettucciari K, Bassotti G, Jergens A.E., Suchodolski J.S. Effects of probiotic bacteria on mucosal polyamines levels in dogs with IBD and colonic polyps: a preliminary study. Benef Microbes 2018; 9: 247–55. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0024>.
30. Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Dog and cat nutrient profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA; 2004.
31. National Research Council Committee on Dog and Cat Nutrition (NRC). Nutrient Requirements of Dogs and Cats. Washington, DC: National Academies Press; 2006.
32. Association of the Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Washington, DC, USA; 1995.
33. Carciofi AC, Oliveira L, Valério A, Borges LL, Carvalho F, Brunetto MA, Vasconcellos RS. Comparison of micronized whole soybeans to common protein

sources in dry dog and cat diets. *Anim Feed Sci Technol.* 2009; 151: 251–60.  
<https://doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.01.002>.

34. Brito CBM, Félix AP, Jesus RM, França MI, de Oliveira SG, Krabbe EL, Maiorka A. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. *Anim Feed Sci Technol.* 2009; 159: 150–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.001>.

35. Jourdian G, Dean L, Roseman S. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free siálico acids and their glycosides. *J Biol Chem.* 1971; 246: 430–35.

36. Urrego MIG, Matheus LFDO, Santos KM, Ernandes MC, Monti M, Souza DF, Brunetto MA. Effects of different protein sources on fermentation metabolites and nutrient digestibility of brachycephalic dogs. *J Nutr Sci.* 2017; 6. <https://doi.org/10.1017/jns.2017.46>.